

Citation 4

(Translation of Filing particulars and Abstract)

Japanese Patent Application Laying Open (KOHYO) No. 11-506610
laid open to the public June 15, 1999

Japanese Patent Application No. 9-501017

International Application No. PCT/US96/08405
filed June 3, 1996

International Publication No. WO96/39487
published December 12, 1996

Priority(ies) claimed: U.S. Application No. 08/464,599
filed June 5, 1995

Applicant(s): OSIRIS THERAPEUTICS, INC., U.S.A.

Inventor(s): D.R. MARSHAK et al., U.S. citizens

Title of Invention : CHEMICALLY DEFINED MEDIUM FOR HUMAN MESENCHYMAL
STEM CELLS

Abstract (from WPI):

Method (A) for isolation of sperm with improved function is
comprises:

(a) contacting a sample containing sperm with a solution
comprising a polysaccharide containing arabinose, galactose and/or
hexuronic acid (PCAGH) to form a mixture, where the PCAGH is not
arabinogalactan, and

(b) subjecting the mixture in step (a) to a condition to
separate sperm from the sample, thereby isolating sperm with improved
function.

USE - The products and methods are used for enhancing
fertilisation in animals, e.g. human, bovine, canine, porcine, avian
and rodent species (all claimed).

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-506610

(43) 公表日 平成11年(1999) 6月15日

(51) Int.Cl.⁸

C 1 2 N 5/06

識別記号

F I

C 1 2 N 5/00

E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願平9-501017
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996) 6月3日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 11月28日
 (86) 国際出願番号 PCT/US 96/08405
 (87) 国際公開番号 WO 96/39487
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 12月12日
 (31) 優先権主張番号 08/464, 599
 (32) 優先日 1995年6月5日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), AU, CA, J P

(71) 出願人 オシリス セラピューティクス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国, 21231-2001 メリーランド, ボルチモア, アリスアンナ ストリート 2001
 (72) 発明者 マーシャク, ダニエル, アール.
 アメリカ合衆国, 11724 ニューヨーク, コールド スプリング ハーバー, パンタウン ロード 1
 (72) 発明者 ホールセック, ジェイムズ, ジェイ.
 アメリカ合衆国, 44139 オハイオ, ソロン, クロムウェル ドライブ 7376
 (74) 代理人 弁理士 丹羽 宏之

(54) 【発明の名称】 ヒト間葉幹細胞用合成培地

(57) 【要約】

無血清環境下でヒト間葉前駆細胞の生存度を維持する一つの組成物および方法であって、その組成物が (1) 最小必須培地、(2) 血清アルブミン、(3) 鉄源、(4) インスリンあるいはインスリン状成長因子、および (5) グルタミン、アルギニンおよびシステインより選択される少なくとも1個のアミノ酸を含み、また無血清である組成物および方法。また無血清環境下でヒト間葉前駆細胞を培養拡張する一つの組成物および方法。この組成物は更に分裂促進因子、とりわけセロトニン含有作用薬を含む。細胞は望ましくは分離されたヒト間葉幹細胞である。

【特許請求の範囲】

1. 無血清環境下でヒト間葉前駆細胞の生存度を維持する一つの組成物であって、この組成物が（１）最小必須培地、（２）血清アルブミン、（３）鉄源、（４）インスリンあるいはインスリン状成長因子、および（５）グルタミンを含み、また無血清であることを特徴とする組成物。
2. 請求の範囲第１項記載の組成物であって、ここで鉄源がトランスフェリンであることを特徴とする組成物。
3. 請求の範囲第１項記載の組成物であって、ここでインスリン状成長因子がIGF-1あるいはIGF-2であることを特徴とする組成物。
4. 請求の範囲第１項記載の組成物であって、更に脂質を含むことを特徴とする組成物。
5. 請求の範囲第１項記載の組成物であって、更にヒト間葉始原細胞を含むことを特徴とする組成物。
6. 無血清環境下でヒト間葉前駆細胞の生存度を維持する一つの方法であって、この方法が無血清の培地で生存可能ヒト間葉前駆細胞を維持することを含み、またこの培地が（１）最小必須培地、（２）血清アルブミン、（３）鉄源、（４）インスリンあるいはインスリン状成長因子、および（５）グルタミンを含み、また無血清であることを特徴とする一つの方法。
7. 請求の範囲第６項記載の方法であって、ここで鉄源がトランスフェリンであることを特徴とする方法。
8. 請求の範囲第６項記載の方法であって、ここでインスリン状成長因子がIGF-1あるいはIGF-2であることを特徴とする方法。
9. 請求の範囲第６項記載の方法であって、ここで組成物が更に脂質を含むことを特徴とする方法。
10. 請求の範囲第６項記載の方法であって、更に抗酸化剤を含むことを特徴とする方法。
11. 請求の範囲第１０項記載の方法であって、ここで抗酸化剤がアスコルビン

酸あるいはその類似体もしくは誘導体であることを特徴とする方法。

12. 無血清環境下でヒト間葉前駆細胞を培養拡張する一つの組成物であって、この組成物が(1)最小必須培地、(2)血清アルブミン、(3)鉄源、(4)インスリンあるいはインスリン状成長因子、(5)グルタミン、および(6)分裂促進因子を含み、また無血清であることを特徴とする組成物。

13. 請求の範囲第12項記載の組成物であって、ここで鉄源がトランスフェリンであることを特徴とする組成物。

14. 請求の範囲第12項記載の組成物であって、ここでインスリン状成長因子がIGF-1あるいはIGF-2であることを特徴とする組成物。

15. 請求の範囲第12項記載の組成物であって、更に脂質を含むことを特徴とする組成物。

16. 請求の範囲第12項記載の組成物であって、ここで分裂促進因子が成長因子であることを特徴とする組成物。

17. 請求の範囲第16項記載の組成物であって、ここで成長因子が血小板由来成長因子であることを特徴とする組成物。

18. 請求の範囲第12項記載の組成物であって、ここで分裂

促進因子がセロトニン含有作用薬であることを特徴とする組成物。

19. 請求の範囲第18項記載の組成物であって、ここでセロトニン含有作用薬がセロトニンであることを特徴とする組成物。

20. 請求の範囲第12項記載の組成物であって、更にヒト間葉始原細胞を含むことを特徴とする組成物。

21. 請求の範囲第20項記載の組成物であって、ここでヒト間葉始原細胞がヒト間葉幹細胞であることを特徴とする組成物。

22. 無血清環境下でヒト間葉前駆細胞を培養拡張する一つの方法であって、この方法が無血清の培地で生存可能ヒト間葉前駆細胞を培養することを含み、またこの培地が(1)最小必須培地、(2)血清アルブミン、(3)鉄源、(4)インスリンあるいはインスリン状成長因子、(5)グルタミン、および(6)分裂促進因子を含み、また無血清であることを特徴とする一つの方法。

23. 請求の範囲第22項記載の方法であって、ここで鉄源がトランスフェリンであることを特徴とする方法。

24. 請求の範囲第22項記載の方法であって、ここでインスリン状成長因子がIGF-1あるいはIGF-2であることを特徴とする方法。

25. 請求の範囲第22項記載の方法であって、ここで組成物が更に脂質を含むことを特徴とする方法。

26. 請求の範囲第22項記載の方法であって、ここで組成物

が更に抗酸化剤を含むことを特徴とする方法。

27. 請求の範囲第26項記載の方法であって、ここで抗酸化剤がアスコルビン酸あるいはその類似体もしくは誘導体であることを特徴とする方法。

28. 請求の範囲第22項記載の方法であって、ここで分裂促進因子が成長因子であることを特徴とする方法。

29. 請求の範囲第28項記載の方法であって、ここで成長因子が血小板由来成長因子であることを特徴とする方法。

30. 請求の範囲第22項記載の方法であって、ここで分裂促進因子がセロトニン含有作用薬であることを特徴とする方法。

31. 請求の範囲第30項記載の方法であって、ここでセロトニン含有作用薬がセロトニンであることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

ヒト間葉幹細胞用合成培地

この発明は細胞および組織培養培地、とりわけ血清不在下で細胞の生存度およびもしくは成長を支持できるような培地に関する。

骨髓は造血、内皮および支質要素よりなる複組織である。骨髓支質は造血の物理的足場および適切な化学的環境を提供する細胞および基質の網（ネットワーク）よりなる。支質細胞集団に含まれるものは繊維芽細胞、網状赤血球、脂肪細胞および骨形成細胞である。骨髓支質細胞集団内で、繊維芽細胞、脂肪細胞形成、網構造、骨形成および軟骨形成能を持つ幹細胞が存在すると仮定されてきた。これらの細胞は間葉幹細胞（MSCs）として引用される。全骨髓の導入、骨髓細胞の懸濁あるいは培養された骨髓誘導間葉細胞に続く拡散チャンバ内での骨および軟骨の成長は、MSCsがとりわけ骨髓から分離できる骨軟骨始原細胞であるという概念を支持する。全骨髓および培養骨髓誘導繊維芽細胞は更に有孔リン酸トリカルシウム-ヒドロキシアパタイトセラミックキューブ（立方体）と組合されそれが次いで同系あるいは免疫無防備状態宿主に皮下に移植された時に骨および軟骨を生じさせた。

ヒト、ラット、マウス、イヌ、ラビットおよびトリ供与体からの培養骨髓誘導MSCsがセラミックキューブ検定で使用された時に骨形成が観察された。これらすべての源からの細胞は

血清補充培地で試験管内で維持された。血清はアミノ酸、脂質、成長因子、ビタミン、ホルモンおよび付着因子などの成分を提供しpH緩衝剤として作用したプロテアーゼ阻害剤を提供することによって試験管内の細胞成長にきわめて重要な役割を果す（バーンズおよび佐藤、分析生化学、102巻、270ページ、1980年；イスコープ、分子および細胞生物学のための細胞培養法、（D. W. バーンズ他編）、169-185ページ、1984年；およびバーンズ、バイオテクニクス、5巻、534-541ページ、1987年）。しかし異なったロットの血清の変化の度合の高さ、血清成分の特徴付けの度合の相対的な貧困、および購入前の血清の入念な検査の必要性が血清の合成培地への置換を非常に望まし

いものにする。

これらMSCsの成長および拡張はウシ胎児血清で強化されて栄養を与えられた培地で達成される。血清の補充はそれが細胞に栄養物、付加要素、および試験管内生存に必要な成長因子を提供するので有用ではあるが（バーンズ、前掲、1980年および1987年；イスコーブ、前掲、1984年）、高いコスト、ロット毎の変化および高価な選別法が必要であるという点で血清の使用は問題である。時間とコストの問題に加えて、血清の使用は更にペプチド成長因子および小さな分子が試験管内での細胞の分化および成長に与える作用を研究するいずれかの研究を複雑にする。現在ラット骨髓誘導間葉幹細胞（レノン他、1995年、提出済み）およびヒト骨髓造血幹細胞のいくつかのもの（イスコーブ、前掲、1984年；ドルーエット他、血液学ブリティッシュ・ジャーナル、73巻、143-1

47ページ、1989年；およびサンドストローム他、バイオテクノロジーおよびバイオエンジニアリング、43巻、706-733ページ、1994年）の成長および拡張のための合成培地はあるが、ヒトMSCsの成長を支持するものは一つもない。

この発明は血清の不在下で間葉始原細胞の生存度およびもしくは成長を支持する化学的に定義された成分の組成物についての発明者の発見にもとづいている。

かくして一つの見地において、この発明は無血清環境下でのヒト間葉前駆細胞の生存度を維持するための組成物を提供し、その組成物は（1）最小必須培地、（2）血清アルブミン、（3）鉄源、（4）インスリンあるいはインスリン状成長因子、および（5）グルタミンを含むが無血清である。この見地は更に少なくとも1個のヒト間葉始原細胞、とりわけ分離ヒト間葉幹細胞と組合せた水液体形態の組成物を検討する。

この発明は更に無血清環境下でのヒト間葉前駆細胞の生存度を維持するための一つの方法を提供し、この方法は無血清の培地において生存可能なヒト間葉前駆細胞を維持することを含み、その培地は（1）最小必須培地、（2）血清アルブミン、（3）鉄源、（4）インスリンあるいはインスリン状成長因子、および（

5) グルタミンを含みまた無血清である。

この発明は更に無血清環境下でのヒト間葉前駆細胞の培養拡張のための一つの組成物を提供し、この組成物は(1) 最小必須培地、(2) 血清アルブミン、(3) 鉄源、(4) インスリンあるいはインスリン状成長因子、(5) グルタミン、および

(6) 分裂促進因子を含みまた無血清である。この見地は更に少なくとも1個のヒト間葉始原細胞、とりわけ分離ヒト間葉幹細胞と組合せた水液体形態の組成物を検討する。

この発明は更に無血清環境下でのヒト間葉前駆細胞の培養拡張のための一つの方法を提供し、この方法は無血清の培地において生存可能なヒト間葉前駆細胞を培養することを含み、その培地は(1) 最小必須培地、(2) 血清アルブミン、(3) 鉄源、(4) インスリンあるいはインスリン状成長因子、(5) グルタミン、および(6) 分裂促進因子を含みまた無血清である。

この発明はこれから図面のそれぞれの簡単な説明を引用して更に説明されるが、それはこの発明の範囲を決して制限するものではない。

図1Aおよび1Bはそれぞれこの発明の(PDGF- $\beta\beta$ を含む)合成培地あるいはクリスタルバイオレット染色結合検定で作られた(血清を含む)完全培地で培養されたヒトMSCs増殖の比較を図で示す。

図2Aおよび2BはヒトMSCsがセロトニン濃度の一定の範囲の存在下およびそれぞれPDGFの存在あるいは不在下でこの発明の合成培地で6日間成長した時に観察されたMSCs増殖応答を図で示す。

図3Aおよび3Bはそれぞれ完全培地およびこの発明の合成培地で培養されたヒトMSCsの顕微鏡写真である。

図4Aおよび4Bは骨形成補充剤(OS)有りもしくは無しで合成培地あるいは完全培地で成長したヒトMSCsのアルカ

リ性ホスファターゼで測定された骨形成分化の水準を以下の通り図で示す。

図4AはOS有りの合成培地で成長した細胞がアルカリ性ホスファターゼ活性

の増加を示し、それはOS無しの合成培地(CDM)の細胞のそれよりも高くまたOS有りの完全培地で成長した細胞のそれと比較し得るものであったことを示す。また、

図4Bはこの観察された増加がアルカリ性ホスファターゼが細胞数と関連して標準化された時においてもなお明らかであったことを示す。

この発明はそれを支持する数多くの実施例と関連してより詳細に説明されるであろう。

ここで使用されるように、「最小必須培地」という用語は、試験管内でヒト間葉幹細胞の生存度を支持する既知の組成物のいずれかの無血清動物細胞培養製剤あるいは培地を引用する。その例はいずれかのイーグル基本培地、すなわちダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)、イスコーブ修飾イーグル培地、アルファ修飾イーグル培地、およびマッコイ5AおよびBGJ。(フィットン-ジャクソン・モディフィケーション)がある。

ここで使用されるように、「アルブミン」という用語は、オボアルブミン、ラクトアルブミン、あるいは穀物もしくは大豆アルブミンなどの他の形態のアルブミンではなくて、哺乳種の血清アルブミンを引用する。

ここで使用されるように、「鉄源」という用語は、必ずしも

それに限定されないがトランスフェリン、 FeSO_4 あるいはフェリチンを含み、培地に還元、第二鉄、鉄の形態を放出するいずれかの種を引用する。

ここで使用されるように、「インスリン」という用語は既知の各種のインスリンのいずれかを引用する。インスリンは皮下投与に続く作用の敏速性、持続性および強度に従って3種の部類、すなわち前記の通り迅速、中間あるいは長期作用性(インスリン)に分割される。結晶性正常インスリンは塩化亜鉛の存在下で沈殿により調製され、修飾形態が活性のパターンを変更するために展開されてきた。プロタミン亜鉛インスリン(PZI)は塩基性タンパク質、プロタミンと共にインスリンおよび亜鉛の反応の結果であり、それは結晶性正常インスリンよりも溶解しよりゆるやかに吸収されるが安定した割合で吸収が信頼度の高いタンパク質複合体を形成する。アイソファンは修飾結晶性プロタミン亜鉛インスリンであ

り、その作用は主力の正常インスリンと少ない部分のプロタミン亜鉛インスリンの混合物と比較可能である。延長敏速インスリン-亜鉛懸濁液もまたこの発明の使用のために考慮される。インスリンは例えばヒト、ウシ、羊あるいは他の動物起原のものであり得るし、また組み換え産物であることもできる。

ヒトインスリンは組み換えDNA技術によるその生産の結果として今や広範に利用できる。理論上は、それは精製ブタインスリンよりも免疫性が僅かながら少なく、代りにそれはウシインスリンよりも当然免疫性が少なくなければならない。ウシインスリンは3個のアミノ酸残基によりヒトインスリンとは異

なっており、一方ブタはB鎖のカルボキシル末端にある1個のみのアミノ酸によりヒトインスリンと異なっている。しかし高度に精製された場合には、3個すべてのインスリンは免疫応答を刺激する比較的低い測定可能な能力を有する。

短作用性あるいは急速作用性インスリンは中性pHで緩衝液に溶解された正常結晶性亜鉛インスリン（インスリン注射）の単なる溶液である。これらはもっとも急速な作用開始を有するが最短の持続期間しか持たない、つまりグルコース水準は20-30分で最低の状態に達し、約2-3時間で基線に戻る。

中間作用インスリンはそれが皮下に投与された時によりゆるやかに溶解するように処方される。かくしてその作用の持続性はより長い。もっとも頻繁に使用される2個の製剤は中性プロタミンハゲドーン（NPH）インスリン（アイソファンインスリン懸濁液）およびレントインスリン（インスリン亜鉛懸濁液）である。NPHインスリンは亜鉛およびプロタミンをリン酸緩衝液に入れた複合体のインスリン懸濁液である。レントインスリンは結晶性（ウルトラレント）および非晶質（セミレント）インスリンの酢酸緩衝液での混合物であり、それはインスリンの溶解性を最小限にする。この製剤は類似の薬物動態学プロファイルを持つ。

ウルトラレントインスリン（延長インスリン亜鉛懸濁液）およびプロタミン亜鉛インスリン懸濁液は長期作用性インスリンである。それらは作用が非常にゆっくりと開始し延長された（「平坦な」）作用の最盛期を有する。これらのインスリンは一日を通じてインスリンの低い基本濃度を提供するものとして

支持される。

ここで使用されるように、インスリンはインスリン類似体を包含するものとしても考慮される。吸収割合を変えたインスリンの最近の発展は関心を呼んでいる。それぞれB 9 およびB 27の位置で置換されたアスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩を持つインスリンは結晶質が少なく「モノマーインスリン」と名付けられている。このインスリンは皮下貯蔵所から急速に吸収されかくして食後の需要に合致して有用である。対照的に他のインスリン類似体は注射の部位で結晶化しよりゆるやかに吸収される。効力を高めたインスリンはB 10の位置でアスパラギン酸塩をヒスチジンに置換したB鎖のカルボキシル末端残基を修飾することにより生産された。

ここで使用されるように、「ソマトメジン」あるいは「インスリン状成長因子」という用語は、ヒトプロインスリンと構造的に関連するペプチドホルモンを引用する。インスリン状成長因子-IあるいはSM-Cは塩基性、7649分子量、70アミノ酸、成長ホルモン(GH)依存型単鎖ペプチドである。インスリン状成長ホルモン-IIは67アミノ酸である。IGF-I構造的に類似した7471分子量の中性ペプチドであるがGH依存性はより少ない。この両方のペプチドは軟骨への硫酸塩とり込みの刺激、筋および脂肪組織でのインスリン状活性、およびとりわけ繊維芽細胞での分裂促進活性を示す。循環SM-Cは主として肝臓で合成される。IGFペプチドの受容体は大抵の細胞で検出される。二つのタイプの受容体が説明されている。タイプI受容体はIGF-Iに対する高い親和性、IGF

-IIに対してはいくらか少ない親和性、またインスリンに対しては低い親和性を示す。タイプII受容体はIGF-IIに対する高い親和性、IGF-Iに対する低いあるいは適度の親和性を示し、インスリンには親和性を示さない。成長ホルモンのその受容体への結合は受容体チロシン残基の自己リン酸化を生じさせる。IGFsは細胞の合成活性を調節する。軟骨ではIGFsは硫酸塩およびロイシンのグリコサミノグリカンへのとり込みおよびプロリンのヒドロキシプロリンへの転換を刺激する。脂肪細胞では、IGFsは糖分解の刺激、脂肪分解の阻害、お

よび糖原分解の阻害を含むインスリン状活性を示す。

ここで使用されるように、「成長因子」という用語は休止細胞に細胞分割を受けさせ、ある場合には分化を受けさせるようにするタンパク質を引用する。ある成長因子は細胞型特異的であり、適切な受容体を持つ細胞のみの分割を刺激する。他の成長因子はその作用においてより一般的である。十分に研究された成長因子の中では、表皮細胞成長因子 (EGF), 神経発育因子 (NGF), 繊維芽細胞成長因子 (FGF), 血小板由来成長因子 (PDGF), エリスロポイエチン、およびインターロイキン (IL-1, IL-2等) およびインターフェロン γ を含むリンホカインと呼ばれるタンパク質の科がある。細胞分割を弱めあるいは予防する成長因子の作用に拮抗する細胞外因子も存在する。形質転換成長因子 β (TGF β) および腫瘍壊死因子 (TNF) がこれらの因子である。

血小板は全血血清で見出され血漿内で消失する分裂促進活性の主な源である。この分裂促進活性を持つ成長因子は

血小板由来成長因子 (PDGF) である。PDGFの分子量は28,000から35,000である。それは2本の鎖で構成され、それは60%の相同性を共有する。A鎖は分子量17,000を持つ。B鎖はPDGFの分裂促進作用に十分である。

血小板由来成長因子はその受容体を運ぶ細胞の分裂促進因子であり、受容能因子として他の成長因子と相乗作用で働く。血小板由来成長因子はEGF受容体へのEGF結合を非相互に阻害し、培養ヒト繊維芽細胞およびブタ大動脈平滑筋細胞によりソマトメジン-C (SM-C) 状因子の生産および放出を刺激する。従ってPDGFは成長因子の合成、分泌、および組織水準での作用を調節する。

ヒトCDMで用いられるとりわけ望ましい成長因子は血小板由来成長因子、とりわけヒト組み換え血小板由来成長因子 (hrPDGF $\beta\beta$) の $\beta\beta$ ホモダイマーである。

ここで使用されるように「抗酸化剤」という用語は炭化水素、油、脂肪あるいはその他の酸化を遅らせ、かくして劣化を遅らせあるいは予防するのに役立ついずれかの物質を引用する。その例はアスコルビン酸およびその類似体、とりわけ

アスコルビン酸-2-リン酸塩を含む。抗酸化剤の他の部類はモノチオグリセロール、ピルビン酸、クエン酸、および酢酸レチノールである。

ここで使用されるように、「抗生物質／抗真菌剤」という用語はヒトおよび動物組織培養に典型的に使用される抗菌剤あるいは抗真菌剤の製剤を引用する。

ここで使用されるように、「必須アミノ酸」という用語はグルタミンあるいはグルタミンに代えて使用できるグルタマックス-I 補充剤（ジブコ）などの商業的に利用できる安定した類似体を引用する。

ここで使用されるように、「脂質」という用語は生物学的脂質を引用する。生物学的脂質は水に不溶あるいはほんの僅かしか溶けない化合物の化学的に異なったグループである。その生物学的機能は等しく異なっている。脂肪および油は多くの生体においてエネルギーの主要な貯蔵形態であり、リン脂質およびステロールは生物膜の質量の約半分を構成する。相対的に少量で存在するけれども、他の脂質は、酵素共同因子、電子運搬体、光吸収顔料、疎水性アンカー、乳化剤、ホルモン、および細胞内メッセンジャーとして重大な役割を果す。

ここで使用されるように、「脂肪酸」は通常は4-36個の炭素原子を含み、望ましくは少なくとも12個の炭素原子、もっとも望ましくは12個乃至22個の炭素原子を含む長鎖カルボン酸を引用する。ある場合には、この炭素鎖は完全に飽和し直鎖であり、一方他は1個もしくはそれ以上の二重結合を含む。それらは飽和、不飽和、分岐あるいは直鎖炭化水素である。いくつかのものは3-炭素環あるいはヒドロキシル基を含む。化合物は一般に界面活性ではない。それは水には殆ど溶解せずまた酸鎖が長ければ長いだけ二重結合はより少なく水への可溶性は低下する。カルボン酸基は極性であり中性pHでイオン化される。これは短鎖酸が水に少しは溶けることを説明するものである。

このような酸の例は3個までの不飽和結合（および分岐）を持つC₁₆からC₂₂までの範囲のものである。飽和直鎖酸の例はn-ドデカン酸、n-テトラデカン酸、n-ヘキサデカン酸、カブロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、モンタン

酸およびメリシン酸である。更に有用なものは不飽和モノオレフィン系直鎖モノカルボン酸である。この例はオレイン酸，パルミトレイン酸，ガドレイン酸およびエルカ酸である。更に有用なものは不飽和（ポリオレフィン系）直鎖モノカルボン酸である。この例はリノール酸，リシノール酸，リノレン酸，アラキドン酸およびベヘノール酸である。有用な分岐酸は例えば酒石酸ジアセチルを含む。

脂肪酸、およびそれを含む化合物の物性は炭化水素鎖の不飽和の長さおよび度合により主として決定される。非極性炭化水素鎖は水への脂肪酸の溶解性の少なさを説明する。脂肪アシル鎖が長く二重結合が少なければそれだけ水への溶解度は低下する。カルボン酸基は極性であり（また中性pHでイオン化され）、短鎖の脂肪酸が水に僅かは溶けることを説明する。

哺乳類では、（遊離カルボキシル基を持つ）遊離脂肪酸はタンパク質担体，血清アルブミンと結合して血液内を循環する。しかし脂肪酸は主としてエステルあるいはアミドなどのカルボン酸誘導体として存在する。電荷カルボキシル基を欠いているために、これらの脂肪酸誘導体は遊離カルボキシル酸よりも一般に水に溶け難い。

脂肪酸から構築されるもっとも単純な脂質はトリグリセリ

ドとして引用されるトリアシルグリセロール，脂肪、あるいは中性脂肪である。トリアシルグリセロールはそのそれぞれが単一グリセロールのエステル結合を持つ3個の脂肪酸で構成される（図9-2）。同じ種類の脂肪酸を全て3個の位置に含むものは単にトリアシルグリセロールと呼ばれ、それを含む脂肪酸に因んで名付けられる。大抵の真核細胞において、トリアシルグリセロールは水性細胞ゾルできわめて微小な油状小滴の個別の相を形成し、代謝燃料の貯蔵所として役立つ。

ここで使用されるように、「リポタンパク質」という用語はアポリポタンパク質と結合する脂質補欠分子族から形成される複合タンパク質を引用する。アポリポタンパク質は器官の間でトリアシルグリセロール，リン脂質，コレステロールおよびコレステリルエステルを輸送するのに責任のある血液内の脂質結合タンパク質である。アポリポタンパク質（「アポ」は無脂質形態にあるタンパク質を意

味する)は各種の脂質を組合せ、いくつかのクラスの脂質タンパク質の粒子、疎水性脂質を核にし親水性タンパク質側鎖および脂質頭部グループを表面にした球形集合体を形成する。脂質およびタンパク質の各種の組合せは、カイロミクロンおよび非常に低密度のリポタンパク質(VLDL)から非常に高密度のリポタンパク質(VHDL)までにわたる異なった密度の粒子を生産し、これらは超遠心分離機で分離することができる。

ここで使用されるように、「可欠アミノ酸」は生理過程に参加しタンパク質合成に使用される既知の天然発生アミノ酸の残渣を引用する。

ここで使用されるように「分裂促進因子」は有糸核分裂およびもしくはリンパ球形質転換を刺激する物質を引用する。

レシチン、ミオイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンおよびホスファチジルコリンなどのリン脂質は細胞膜合成でその利用能を補充するために加えることができる。適切な源は製品「エクスーサイト」(マイルズ、インコーポレイテッド、イリノイ、ネイパービル)で、これは脂肪酸、リン脂質、リポタンパク質およびコレステロールの混合物を含んだものである。

セロトニン(5-ヒドロキシトリプトアミン)は胃腸管を通じて腸管クロム親和細胞に顕著に、血小板および脳の部分に見出される。それは有力な神経伝達物質であることで知られている。それは循環系、呼吸器系および消化器系の神経および平滑筋を刺激し阻害する。その受容体の一つと相互作用する時にセロトニンの作用を模倣するセロトニン含有作用薬が確認されており、例えばイブサピロン、ゼピロン、ブスピロン、1-[2-(4-アミノフェニル)-エチル]-4-(3-ピフルオロメチルフェニル)ピペラジン(PADD)およびN,N-ジブロピル-5-カルボキシアミドトリプタミン(DP-5CT)を含む。更にヘイモン他、セロトニンの神経薬理学において、ホイッタッカー-アズミティアおよびペルースカ(編)、ニューヨーク科学アカデミー年報、600巻、114ページ、1990年を参照されたい。この発明に従ってセロトニンおよびその作用薬が合成培地に含まれる時にヒトMSCsに(有糸核)分裂促進活性を発揮することが発見されている。

ピルビン酸ナトリウムが更にクレブス回路のためのその利用能を補充するために処方に加えることができる。ビオチンもまたカルボキシル基転移反応で重要な補酵素としてその利用能を補充するために処方に加えることができる。ビタミン B 1 2 (シアノコバラミン) およびその補酵素前駆体 (コバラミン) もまた基転移およびメチル化反応のための補酵素としての利用能を補充するために処方に加えることができる。微量元素混合物も電子移送および多くの金属酵素ならびにタンパク質に必要な金属補充源を提供するために処方に加えることができる。ヌクレオシド混合物も DNA および RNA 合成に必要なプリンおよびピリミジン塩基の補充源として処方に加えることができる。

実施例 1

無血清培地におけるヒト MSC s の培養拡張

ヒト MSC s の分離および製剤

ヒト骨髄は正常供与体の腸骨稜から吸引された骨髄からであった。供与体は 19 才から 52 才までの年齢にわたる女性および男性双方を含んでいた。

ヒト間葉幹細胞 (MSC s) はこれまでに報告された方法 (ヘインズワース他、1992 年 a) の修飾を用いて精製され培養された。腸骨稜骨髄 (20-40 ml) が細胞分散のために渦動された。骨髄は選択されたロット (バイオセル) (完全培地) からのウシ胎仔血清 (10%、v/v) で補充されたダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM) 20 ml をそれぞれ含む 3 個の 50 ml 遠心分離管に等しく分割された。細胞は GH

3. 8 水平ローター (ベックマン) に取付けられたベックマン GS-34 卓上型遠心分離機で 5 分 1200 rpm の回転でペレット化された。細胞ペレット (5.0 ml) はパーコル 70% の予備形成成分で積層された。細胞は $460 \times g$ で 15 分成分を遠心分離して分留された。MSC s は成分の上部 25% から分離され、50 ml 遠心分離管に移され完全培地 30 ml で洗浄された。細胞は赤血球を溶解させた後に、血球計数器を使用して計数された。細胞は皿当たり 1×10^7 細胞で 100 mm 組織培養皿で平板培養された。培養物は 95% 空気 5% CO_2 の加湿雰囲気の下で 37℃ に維持され培養培地は 3 乃至 4 日毎に交換された。

ヒトMSCsの培養および継代接種

平板上のコロニーが大きくなり密集に近づくと、細胞は37℃で5分0.25%トリプシン含有1mM、EDTA（ジブコ）で保温することにより取り上げられた。トリプシン反応は細胞サンプルの半量のウシ胎仔血清（ハイクローン）を加えることにより急冷された。細胞は1:3の割合で再平板培養された。第一継代培養は培養が80-90%密集に達した時に再び継代培養された。

無血清合成培地（CDM）に加えられた成分の選別は完全培地に 2.5×10^4 細胞の密度で35mm皿に播種された第二および第三継代細胞を用いて行われた。 3×10^4 の播種密度が試験管内骨形成検定のために使用された。細胞は24時間付着を許された。細胞が付着された後、培地は除去され、細胞層は無血清DMEMで洗浄され試験成分を含む無血清処方が加え

られた。各成分は3回試験され異なった供与体サンプルを用いて第2回目が繰返された。培地はいつもの通り交換され細胞はオリンパス顕微鏡で毎日検討された。

無血清ヒト合成培地（hCDM）

この実施例の無血清処方のための最小必須培地はイスコーブ修飾ダルベッコ培地（IMDM）（ジブコ）であった。IMDMは以下のもので補充された：ヒト血清アルブミン（マイルズ）5mg/ml，ヒトエクスーサイトリポタンパク質（マイルズ）100μg/ml，飽和ヒトトランスフェリン（ベーリンガー・マンハイム）2μg/ml，ヒト組み換えインスリン（ベーリンガー・マンハイム）10μg/ml，100×MEMビタミン（シグマ）1.0%，MEM必須アミノ酸（ジブコ）0.89%，MEM可欠アミノ酸（ジブコ）0.4%，ピルビン酸ナトリウム（ジブコ）1mM，グルタマックス-I補充剤（ジブコ）1mM，葉酸（ジブコ）10μg/ml，アスコルビン酸-2-リン酸塩（ホエイコ・バイオプロダクツ）10μM，ビオチン（ジブコ）1.0μg/ml，ビタミンB12混合物（ジブコ）1.36μg/ml，微量元素混合物（ジブコ）500倍希釈，FeSO₄（シグマ） 4×10^{-8} M，ヌクレオシド混合物（シグマ・リボヌクレオシド，2'-デオキシリボヌクレオシド，ウリジン、およびチミジン

) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 抗生物質/抗真菌物質 (ジブコ) 1.0%, およびヒト組み換えPDGF $\beta\beta$ ホモダイマー (ベーリンガー・マンハイム) $10-20 \text{ ng}/\text{ml}$ もしくは5-ヒドロキシトリプトアミン (シグマ) 10^{-5} 乃至 10^{-6} M のいずれか。

細胞増殖検定

細胞増殖の速度はクリスタルバイオレット染料を用いる比色染料結合検定により測定された。使用された方法はウエスタグレンートルソン他 (1991年) およびレノン他 (1995年) によって説明された方法を修飾したものであった。クリスタルバイオレットは細胞の核に特異的であるため、染色強度は細胞数に比例し、 595 nm で抽出された染料の吸光度を測定することにより定量化することができる。クリスタルバイオレットの各バッチに対して、標準曲線が一定数のMSCs (5×10^3 から 1×10^5 細胞/ 35 mm 皿) の固定数を用いて生成された。線のスロープ (相関係数 = 0.99) は試験ウェルそれぞれで細胞数を計算するのに使用された。増殖検定に対して、ヒトMSCsは平板当たり 2.5 乃至 3×10^4 細胞で 35 mm 平板で平板培養された。平板は7日目に 37°C CO_2 恒温器から除去された。細胞層は2回 1.0 ml のタイロード平衡塩類溶液で洗浄され、次いで15分 1.0 ml のタイロード内で196 (v/v) グルタルアルデヒドで凝固された。細胞層は2回 1.0 ml の水で洗浄され空気乾燥された。細胞は水に対し0.1% (v/v) のクリスタルバイオレットで30分雰囲気温度で染色された。平板は3回水で洗浄され、結合染料は各平板に対し水に対し1.096 (v/v) のトリトンX100、 2.0 ml を加え、室温で4時間回転シェーカーでゆっくり攪拌して抽出された。

抽出染料 ($200 \mu\text{l}$) は96ウェル平板のウェルに移され、吸光度は1.0%のトリトンX100を目標として使用

し、エリザ平板リーダー (バイオラド) で 595 nm で測定された。

アルカリ性ホスファターゼ組織化学

ヒトMSCsのアルカリ性ホスファターゼ活性の水準はアルカリ性ホスファタ

ーゼキット（シグマ）を用いて測定された。平板は設定時間点で37℃CO₂恒温器から除去されPBS 1.0 mlで2回洗浄されクエン酸塩／アセトン溶液で1分凝固された。細胞は各平板にクレシルバイオレット溶液（クレシルバイオレット溶液12 ml内のナフトールAS-MXアルカリ性リン酸塩溶液0.5 ml）を加える前に水（1.0 ml）で2回洗浄された。平板は室温で1時間暗所で保温され、細胞は次いで顕微鏡検査の前に水で2回洗浄され空気乾燥された。

アルカリ性ホスファターゼ活性の定量化

細胞層は2回タイロード（2.0 ml）で洗浄された。基質緩衝液（pH 11、グリシン50 mM、MgCl₂ 1.0 mM）に溶解された基質、リン酸P-ニトロフェノール（シグマ104、錠剤5.0 mg）が各平板に加えられた。平板は37℃で5乃至20分保温された。放出P-ニトロフェノール（PNP）の量がエリザ平板リーダーで405 nmで測定された。酵素活性はPNP放出min⁻¹およびmin⁻¹・10⁶細胞⁻¹の両方で発現された。

無機物含有小節のフォン・コッサ染色

平板は無カルシウムおよび無マグネシウムリン酸緩衝食塩水（2.0 ml）で2回洗浄された。細胞は緩衝ホルマリン10%で1時間凝固され、次いで平板は水（2.0 ml）で2回洗

浄された。水（1.0 ml）に対しAgNO₃、2%（w/v）で暗所で10分保温された。平板は水（3×2.0 ml）で洗浄された。最後の洗浄が平板に残っていた時、それは明るい光に15分露出された。平板は再び水で洗浄され空気乾燥された。

デキサメタゾン補充無血清培地で成長する培養によるアルカリ性ホスファターゼ活性および無機物含有小節形成

アルカリ性ホスファターゼ活性および無機物含有小節形成はデキサメタゾン（10⁻⁷M）、アスコルビン酸-2-リン酸塩（0.05 mM）およびβ-グリセロホスフェート（10 mM）骨形成補充剤（OS）で補充された培地を用いて決定された。密集した第一および第二継代細胞は皿当たり3.0×10⁴細胞の密度で35 mm皿に継代培養された。細胞は通常通り付着が許された。培地は除去さ

れ無血清培地あるいはOSを含む無血清培地で代替された。完全培地が正の対照として使用された。4, 8, 12、および16日に培養物は37℃CO₂恒温器から除去され、細胞増殖、アルカリ性ホスファターゼ活性（組織化学および生化学活性）ならびに無機物含有小節形成が測定された。

セラミックキューブ検定のためのヒトMSCsの製剤

培養MSCsは前述の通り平板からトリプシン消化された。細胞は無血清培地（2×10ml）で洗浄され、計数された。細胞密度は無血清培地でml当たり5×10⁶細胞に調節された。リン酸トリカルシウム60%およびヒドロキシアパタイト40%よりなり（ジンマー・コーポレイション、インディ

アナ、ワルソー）、デニス他（1992年）およびレノン他（1995年）に記述されたように製剤された有孔3mm³セラミックキューブが細胞懸濁液に加えられた。細胞がキューブの孔に確実に浸入するように空気の10%を排出して少し負の大気圧が生成した。細胞を持つキューブは重症複合型免疫不全（SCID）マウスに移植する前に1-2時間37℃で保温された。

免疫細胞化学染色

完全培地でのヒトMSCs（第一から第三継代）は皿当たり30,000細胞で35mm皿に播種され、細胞は無血清培地に切り換える前に16時間付着を許された。細胞は試験培地で3乃至4日成長し、対照平板は完全培地に残された。細胞は3回PBSで洗浄された。培養物は1時間100μlのSH2あるいはSH4ハイブリドーマ培養上澄み（ヘインズワース他、1992年b）のいずれかで保温された。ニワトリ特異的SB1（ブルーダー他）ハイブリドーマ上澄みが負の対照として使用された。平板はPBS溶液（3×2.0ml）内のBSA0.1%で洗浄され、BSA-PBS、0.1%で希釈され、FITC-共役ヤギ抗マウスIgGで45分保温された。皿は再びBSA-PBS（3×2.0ml）0.1%で洗浄された。細胞層はPPD免疫蛍光装着培地の一滴が加えられた後カバースリップで覆われた。免疫蛍光はオリンパスBX50エピフルオレセンス顕微鏡で観察された。

結果

無血清培地におけるヒトMSC増殖

無血清培地におけるヒトMSCsの成長動力学が完全培地で成長したMSCsを正の対照としてクリスタルバイオレット染色結合検定を用いて測定された。ヒトMSCsがPDGF- β 10 mg/mlを含むCDM（合成培地）で培養された時、それは完全培地で成長したこれらの細胞に類似した成長動力学を示した（図1Aおよび1B）。CDMで維持された細胞の増殖は完全培地で維持された培養で観察されるものの一般に80乃至90%であった。しかし細胞増殖は10日から12日までに少し減少した。これらの培養は一般に8日までに80乃至90%密集になるために、8日を越えて観察される細胞増殖の減少は問題があるとは見做されなかった。CDMで成長する細胞の継代はCDMでのこれらの細胞の増殖能力に戻っていた。

ラウダー、TINS、16巻、233-239ページ、1993年は、5-ヒドロキシトリプトアミン（5HT）が細胞増殖および分化などの形態発生活性の調節を伴うことがあることを示唆している。5HTがヒトMSCsの増殖を刺激できたかどうかを決定するために用量応答評価がクリスタルバイオレット細胞増殖検定を用いて行われた。ヒトMSCsは5HTの増加する濃度の存在下で6日間PDGF有りもしくは無しのCDMのいずれかで成長した（それぞれ図2Aおよび2B）。図で示されるように、細胞数に関して5HTの用量応答作用が存在する。MSCs増殖の最適濃度は5HTの 10^{-5} Mから 10^{-6} Mまでの間にあるものと見られる。

細胞形態学

CDMで成長するヒトMSCsの増殖を測定することに加え

て、細胞が正しい形態、つまり完全培地で維持された培養に見られるものに類似していたものを維持するということもまた重要であった。完全培地で維持された第一、第二および第三継代からのヒトMSCsは同一の形態を有し、大抵の細胞は繊維芽細胞形態を有し、そのいくつかは多角形、あるいは円い細胞であった。

CDMで維持されたヒトMSCsは完全培地で成長した細胞に類似した形態を

有していた（図3）。細胞の大多数は完全培地で成長した細胞のように同じ紡錘形繊維芽形態を有していた。CDM培養にもいくらか大きな円形細胞が存在したがこれらの細胞は少数派であった。

SFhDM内でのヒトMSCsの試験管内骨形成

デキサメタゾン、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸-2-リン酸塩がCDMで成長したヒトMSCsの試験管内骨形成能を測定するためにCDM(OS)に加えられた。ヒトMSCsはOS有りもしくは無しのCDM+PDGF $\beta\beta$ で16日間成長した。（組織化学的にかつ生化学的に）骨形成分化アルカリ性ホスファターゼ活性の水準および無機物含有小節形成の度合は4日、8日、12日および16日に測定された。これらの検定のための正の対照はOS有りおよび無しの完全培地で成長したヒトMSCsであった。CDM+OSで成長した細胞はアルカリ性ホスファターゼ活性の増加を示し、それはCDMで成長した細胞のそれよりも高く、また完全培地+OSで成長した細胞のそれと同じであった（図4A）。この観察された増加はアルカリ性ホスファターゼ活性が細胞数で標

準化された時でさえ真実であった（図4B）。組織化学的染色は生化学活性のそれを反映していた。CDM+OSで維持された培養でアルカリ性ホスファターゼ正細胞の数に増加が見られた。この染色パターンは完全培地+OSで成長した細胞のそれと類似していた。16日目にCDM+OSおよび完全培地+OSで維持された培養双方でのアルカリ性ホスファターゼ正細胞は円形および多角形の形態を有していた。16日目にCDMあるいは完全培地のいずれかで維持された細胞はその繊維芽細胞形態を失わなかった。これはアルカリ性ホスファターゼ正および負の細胞双方にとっても真実であった。

フォン・コッサ正染色小節の外観は16日までにCDM+OSおよび完全培地+OS培養で明らかとなった。これらの細胞は12日目に始まり16日目までその数を増加させたフォン・コッサ正小節を有していた。CDMあるいは完全培地で維持された細胞は決してフォン・コッサ正小節を展開しなかった。

セラミックキューブ内での生体内骨形成

ヒトMSCsの骨軟骨形成能がセラミックキューブ内に負荷しヌードマウス内に皮下で移植した時に骨を形成するその能力によって示されている（ヘインズワース他、1992年a）。CDMで成長するヒトMSCsの骨軟骨形成能を決定するために、これらの細胞はCDMで成長し、セラミックキューブに負荷されSCIDマウスに移植された。SCIDマウスが使用されたのはヒト細胞に対する免疫応答がないためである。第一および第二継代のヒトMSCsは皿当たり 3×10^5 細胞の密度で100mm組織培養平板での完全培地で継代培養された。細胞

が（16時間）付着された後、培養物はCDM+PDGFに切り換える前に無菌タイロードで2回洗浄された。培養が密集に近くなるまでMSCsはこの培地で成長した。MSCsは次いで収穫され、セラミックキューブに負荷されSCIDマウスの皮下に移植された。このキューブは3週および6週に収穫された。

対照MSCsあるいはCDMで成長したMSCsで負荷されたセラミックキューブは移植3週後骨に関しては負であった。CDMあるいは完全培地で成長した細胞のいずれかを含む移植6週後のキューブは骨に関しては正であった。SCIDマウスで保温の6週後、骨はCDM+PDGFで成長したMSCsを含むキューブの85%から90%が骨を含んでいたのに比較して対照MSCsを含むセラミックキューブの90%から100%で観察された。

MSCsの免疫組織化学染色

CDMで成長する細胞を更に特徴付けるために、これらの細胞はヒトMSCsのSH抗原特性の発現を精査された（ヘインズワース他、1992年b）。第二継代からのヒトMSCsに対する抗体SH4およびSH2の免疫反応はCDMおよび完全培地で成長する両方の細胞において明らかであった。完全培地あるいはCDMのいずれかで維持された時にはヒトMSCsに対するSH抗体の反応性には顕著な差異は観察されなかった。抗体および反応性はSH2よりもSH4の方がはるかに大きかった。これは完全培地で維持される細胞にとっても更に真実であった。

【図1】

FIG. 1A

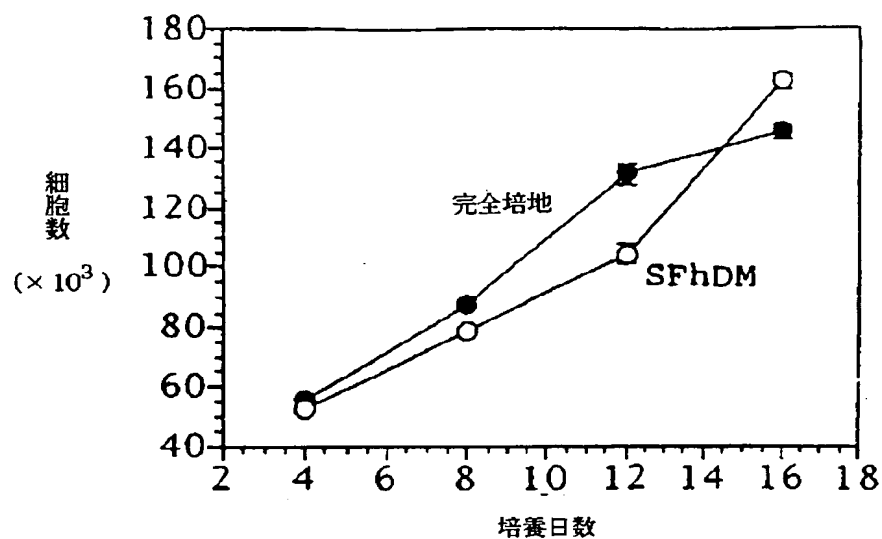
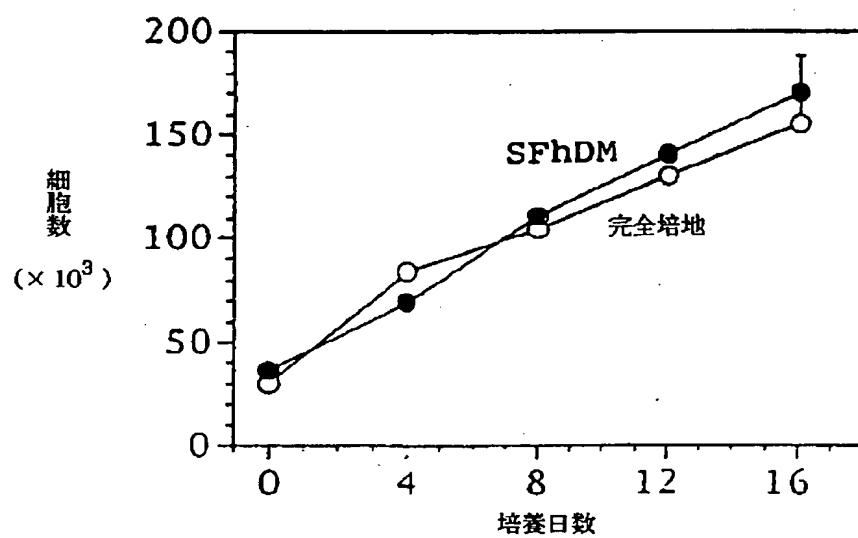


FIG. 1B



【図2】

FIG. 2A

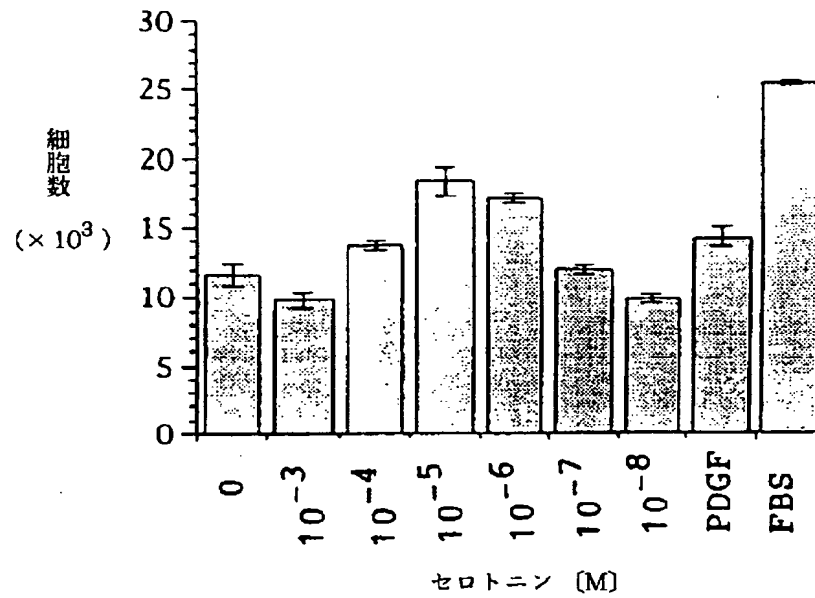
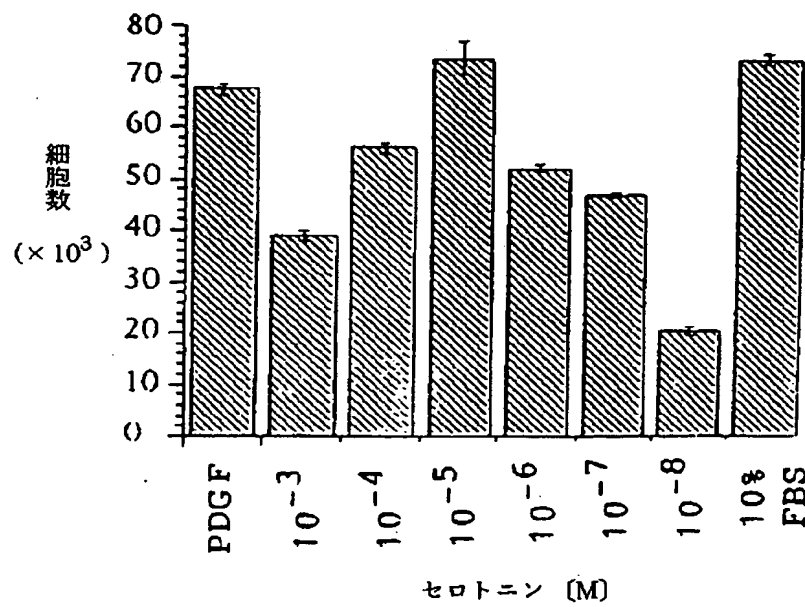


FIG. 2B



【図3】

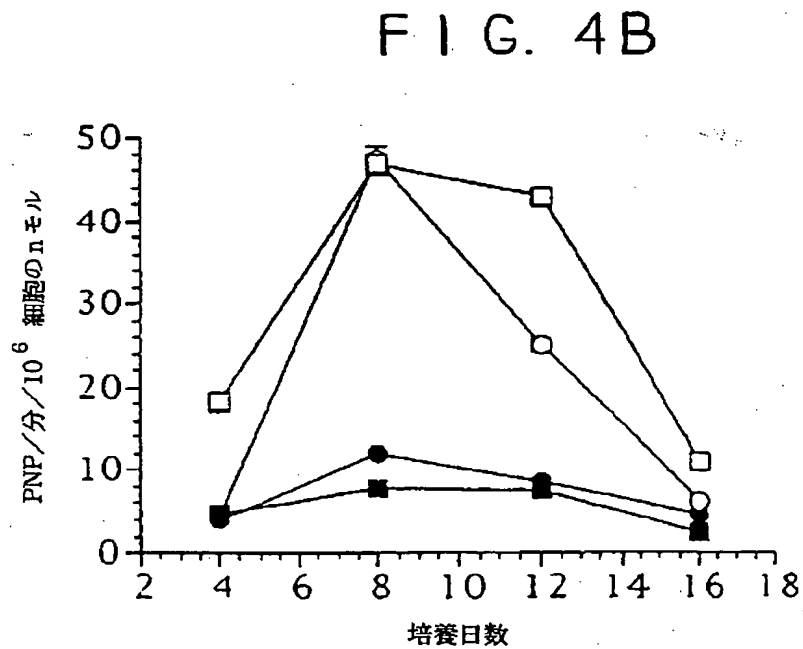
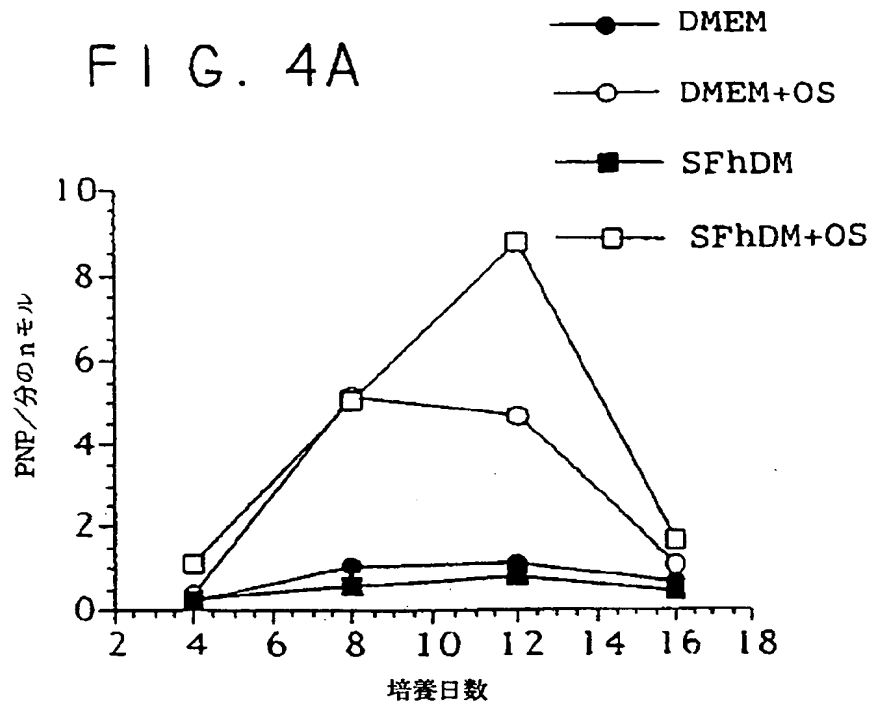
FIG. 3A



FIG. 3B



【図4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/08405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C12N 5/00 US CL : 435/240.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/240.1, 69.4, 70.3, 240.2, 240.3, 240.21; 424/93.7, 93.1; 530/363 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BROWER et al. Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium. Cancer Research. February 1986, Vol. 46, pages 798-806, see entire document.	1, 2, 6, 7, 10-13, 16, 17, 22, 23, 26-29
Y	MAURER, H.R. 'Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture,' In: Animal cell culture: a practical approach. Edited by R.I. Freshney. Washington, D.C.: IRL Press Limited, 1986, pages 13-19, especially pages 16, 19.	1-4, 6-17, 22-29
Y	US 4,444,778 A (S. COUGHLIN) 24 April 1984 (24.04.84), especially column 1.	18, 19, 30, 31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 JULY 1996		Date of mailing of the international search report 17 JUL 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3330		Authorized officer JHUNG-WON COLBY, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/08405

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JESSOP et al. The differentiation of a potential mesenchymal stem cell population within ovine bone marrow. Biochemical Society Transactions. 1994, Vol. 22, page 248S, entire document.	5, 20, 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/08405

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, CAS

search terms: serotonin? or serotonergic agonist? or neurotransmitter? or vasoconstrictor? or tryptophan?; serum-free
medi?; mesenchymal progenitor? or mesenchymal stem cell? or mesenchymal progenitor cell?; holecek, james j;
albumin?; iron? or transferrin?; insulin? or insulin-like growth factor? or igf?; glutamine; mitogen? or growth factor?;
lipid; antioxidant? or ascorbic acid?